

АНАЛІЗ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ

Рекомендована д. фармац. наук, проф. С. О. Васюк

УДК 661.122+547.825

DOI 10.11603/2312-0967.2016.4.7115

ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ І СУПУТНИХ ДОМІШОК ПРОТІОНАМІДУ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Н. Л. Тарасенко, А. Р. Шостак, В. М. Брицун, Н. В. Останіна

ДУ «Інститут громадського здоров'я імені О. М. Марзєєва
Національної академії медичних наук України», Київ

Резюме: з метою оцінки якості здійснено кількісне визначення і контроль супутніх домішок протитуберкульозного препарату II ряду протіонаміду. Дослідження проводились методом обернено-фазової вискоєфективної рідинної хроматографії, на спектрофотометричному детекторі, в ізократичному режимі з детектуванням в УФ-області спектра. Кількісне визначення основної речовини зроблено з використанням зовнішнього стандарту. Для встановлення кількості домішок був застосований метод порівняння з розведеним розчином основної речовини. Показано, що за перевіреними параметрами лікарський препарат відповідає вимогам нормативних документів: містить 99,7 % від заявленої кількості протіонаміду і $\leq 0,54$ % домішок.

Ключові слова: протіонамід, таблетки, туберкульоз, препарати II ряду, контроль якості, ВЕРХ, кількісне визначення, супровідні домішки.

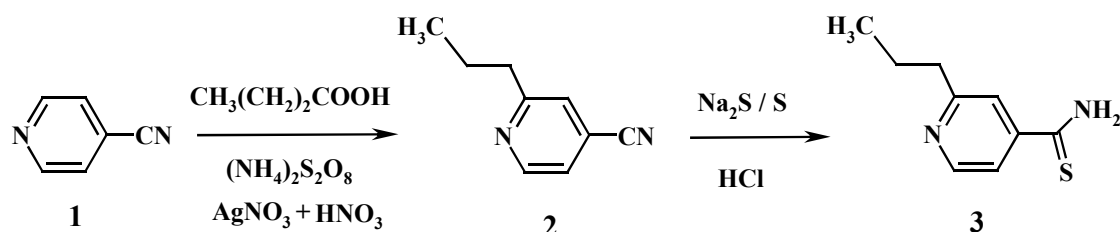
Вступ. Туберкульоз – інфекційне захворювання, яке зумовлено паличкою Коха (*Mycobacterium tuberculosis*). В доіндустріальну епоху, до винаходу і промислового виробництва ізоніазиду та інших лікарських засобів, туберкульоз забрав мільйони людських життів. У XX столітті, в зв'язку з прогресом медицини, охорони здоров'я та фармацевтики, у високорозвинутих країнах кількість захворювань на туберкульоз різко зменшилась [8–10].

Проте в Україні кількість інфікованих громадян стала збільшуватись з 1991 р., а епідемія туберкульозу офіційно зафіксована з 1995 р. [4]. Серед європейських країн наша держава займає 2-ге місце за захворюваністю на туберкульоз [5]. Причини такої ситуації полягають в нестабільній економічній та політичній ситуації, наявності значних соціальних проблем та появи нових хіміорезистентних штамів мікобактерій.

Препарати I ряду – основні, характеризуються високою активністю та порівняно низькою токсичністю. Препарати II ряду – резервні. Вони менш ефективні, токсичніші і часто – дорожчі за препарати I ряду. Проте у випадках слабкої дії чи індивідуального несприйняття препаратів I ряду застосовують саме препарати II ряду. Варто зазначити, що пошук нових антимікобактеріальних засобів продовжується й понині [1, 8].

Одним з препаратів резервної групи є протіонамід, який пригнічує у мікобактерій синтез пептидів і міколевих кислот та проявляє бактеріостатичну дію.

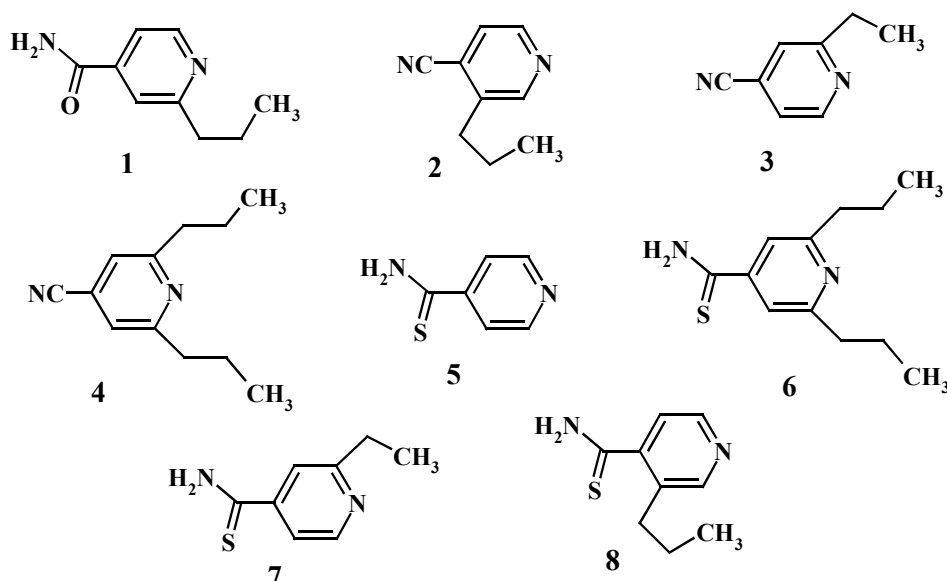
У промисловості і фармацевтичних лабораторіях протіонамід **3** отримують окиснювальним алкілуванням 4-нітрилпіридину **1** *n*-масляною кислотою з подальшим дигідротіонуванням проміжного 4-нітрил-2-пропілпіридину **2** сульфідом натрію в солянокислому середовищі [6].



Тому надзвичайно актуальним є ефективне лікування цього захворювання, яке провадиться з застосуванням препаратів I (ізоніазид, рифампіцин, піразинамід, етамбутол, стрептоміцин) і II рядів (етіонамід, протіонамід, канаміцин, амікацин, ципрофлоксацин, офлоксацин, циклосерин, капреоміцин, рифабутин, пара-аміносаліцилова кислота, тіоацетазон) [3].

Перша стадія є випадком неузгодженої орієнтації замісників піридинового ядра щодо напрямку електрофільної реакції. Друга стадія також характеризується наявністю побічних процесів. Крім того, при зберіганні протіонаміду можливий частковий розклад (деградація) діючої речовини. Тому субстанція протіонаміду містить домішки. В роботі [6] хімічну бу-

дову деяких із них (сполуки 1-8) було з'ясовано методами спектроскопії ЯМР, ІЧ-спектроскопії та мас-спектрометрії:



Ці сполуки мають близьку до протіонаміду молекулярну масу, схожу розчинність і є основними домішками його субстанції та інших лікарських форм.

Як і всі лікарські засоби в Україні, протіонамід повинен відповідати стандартам якості, що регламентовані Державною фармакопеею України, документами Державного експертного центру МОЗ України і Державної служби України з лікарських засобів та контролю за наркотиками.

Перевірка лікарських засобів в Україні щодо відповідності якісних і кількісних показників виконується в спеціалізованих аналітичних лабораторіях, що мають діючу атестацію та акредитацію [7].

Мета дослідження: встановлення методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) кількісного вмісту і супутніх домішок таблеток протіонаміду (іноземного виробництва) на предмет відповідності вимогам документації виробника.

Статистичний аналіз отриманих результатів і оцінку невизначеності проводили згідно з вимогами ДФУ (підрозділ 5.3) [2].

Тест придатності хроматографічної системи відповідав заявленим вимогам (для 5-ти паралельних інжекцій середнє значення коефіцієнта симетрії піків знаходилось в межах 1,05-1,12, відносно стандартне відхилення площ піків розчину порівняння менше 2,0 %).

Методи досліджень. Дослідження здійснювали на хроматографі Agilent 1200 з спектрофотометричним детектором, методом обернено-фазової ВЕРХ в ізократичному режимі з детектуванням в УФ-області спектру.

Використовувалась колонка Zorbax SB-C18 (довжина 150 мм, діаметр 4,6 мм, зерно 3 мкм), температура колонки 25° С, швидкість рухомої

фази 0,5 мл/хв, $\lambda = 290$ нм, об'єм інжектування 20 мкл, рухома фаза – фосфатний буфер : ацетонітрил.

Розчин порівняння для кількісного визначення: вміщують 50,98 мг стандартного зразку протіонаміду в мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 70 мл рухомої фази, перемішують до розчинення і додають того ж розчинника до мітки. Відбирають 5,0 мл цього розчину і додають рухомої фази до об'єму 50,0 мл. Концентрація 50,98 мкг/мл.

Випробовуваний розчин для кількісного визначення: 58,4 мг порошку розтертих таблеток протіонаміду всипають в мірну колбу об'ємом 100,0 мл, додають 70 мл рухомої фази, перемішують до розчинення. Додають того ж розчинника до мітки і фільтрують. Відбирають 5,0 мл цього розчину і додають рухомої фази до об'єму 50,0 мл. Приблизна концентрація 50 мкг/мл.

Результати хроматографічних досліджень порівняльного і випробовуваного розчинів наведено в таблиці 1.

Випробовуваний розчин для визначення супровідних домішок: вміщують 50,98 мг стандартного зразку протіонаміду в мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 70 мл рухомої фази, перемішують до розчинення, додають того ж розчинника до мітки і перемішують. Концентрація 0,5098 мг/мл.

Еталонний 1 % розчин протіонаміду для визначення супровідних домішок: вміщують 50,98 мг стандартного зразку протіонаміду в мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 70 мл рухомої фази, перемішують до розчинення і додають того ж розчинника до мітки. Переносять 1,0 мл вищевказаного розчину в мірну колбу на 100,0 мл, додають того ж розчинника до мітки і перемішують. Концентрація 5,098 мкг/мл.

Результати хроматографічних досліджень еталонного і випробовуваного розчинів наведені, відповідно, в таблицях 2 і 3.

Таблиця 1. Кількісне визначення протіонамід у методом ВЕРХ

№	Розчин порівняння		Випробовуваний розчин	
	Час утримування, хв	Площа піків	Час утримування, хв	Площа піків
1	6,382	5771,833	6,381	5610,879
2	6,377	5776,754	6,387	5607,701
3	6,376	5771,754	6,376	5608,234
4	6,392	5769,395	6,379	5603,352
5	6,367	5783,680	6,393	5622,303
Середнє значення	6,379	5774,683	6,383	5610,494
Відносне стандартне відхил., %	0,14	0,10	0,11	0,13

Таблиця 2. Результати хроматографування 1 % розчину протіонамід у

№	Час утримування, хв	Площа піків	№	Час утримування, хв	Площа піків
1	6,386	573,142	4	6,371	573,294
2	6,384	573,660	5	6,397	572,842
3	6,387	575,111	Середнє	6,385	573,610
			Відн.ст. відх.,%	0,15	0,16

Таблиця 3. Визначення методом ВЕРХ супутніх домішок протіонамід у випробовуваному розчині

№	Сполука	Час утримування, хв	Площа піків	№	Сполука	Час утримування, хв	Площа піків
1	Невідома домішка 1	2,707	50,368	6	Невідома домішка 6	5,773	148,727
		2,702	49,772			5,766	148,976
		2,702	49,686			5,770	148,931
	Середнє	2,704	49,942		Середнє	5,770	148,878
	Відн. ст. відх.,%	0,11	0,74		Відн. ст. відх.,%	0,06	0,09
2	Невідома домішка 2	3,749	6,245	7	Протіонамід	6,386	36453,1
		3,741	6,548			6,391	36328,8
		3,747	6,687			6,408	36317,9
	Середнє	3,746	6,493		Середнє	6,395	36366,6
	Відн. ст. відх.,%	0,11	0,23		Відн. ст. відх.,%	0,18	0,21
3	Невідома домішка 3	4,185	16,283	8	Невідома домішка 7	11,939	3,573
		4,179	16,368			12,001	3,511
		4,181	16,639			11,921	3,534
	Середнє	4,182	16,430		Середнє	11,954	3,539
	Відн. ст. відх.,%	0,07	1,13		Відн. ст. відх.,%	0,35	0,89
4	Невідома домішка 4	4,807	3,594	9	Невідома домішка 8	21,385	7,828
		4,805	3,607			21,457	7,596
		4,808	3,636			21,363	7,678
	Середнє	4,807	3,612		Середнє	21,402	7,701
	Відн. ст. відх.,%	0,03	0,60		Відн. ст. відх.,%	0,23	1,53
5	Невідома домішка 5	5,208	74,202		-	-	-
		5,201	74,046			-	-
		5,203	73,807			-	-
	Середнє	5,204	74,018		-	-	-
	Відн. ст. відх.,%	0,07	0,27		-	-	-

Примітка: коефіцієнт симетрії піків на хроматограмах 1,02–1,18.

Результати й обговорення. Кількісне визначення проводили методом зовнішнього стандарту [2]: розчин порівняння і випробовуваний розчини поперемінно хроматографували і розраховували середні значення площ піків протіонаміду (див. табл. 1).

Заявлена кількість протіонаміду у таблетці 250 мг, нормування протягом терміну придатності 92,5–107,5 % від заявленої кількості (тобто 231,25–268,75 мг).

Вміст протіонаміду (мг) обчислювали за формулою:

$$C_{\text{прот}} = (S_{\text{випр}} \times m_{\text{ст}} \times A_{\text{т}} \times P) / (S_{\text{пор}} \times T),$$

де $S_{\text{випр}}$ – середня площа піка протіонаміду на хроматограмі випробовуваного розчину, $m_{\text{ст}}$ – наважка стандартного зразка протіонаміду (мг), $A_{\text{т}}$ – середня маса таблеток (296,12 мг), P – чистота стандартного зразка (0,992), $S_{\text{пор}}$ – середня площа піка протіонаміду на хроматограмі розчину порівняння, T

після чого обчислювався вміст домішок. Результати випробовувань наведені в таблицях 2 і 3, а хроматограма досліджуваного розчину протіонаміду відображена на рисунку 1.

Для досліджуваних таблеток протіонаміду виробником були встановлені вимоги щодо вмісту супутніх домішок – не більше 1,0 % (індивідуальної домішки не більше 0,5 %).

Загальну кількість домішок рахували за формулою:

$$\%_{\text{доміш}} = S_{\text{дом}} / S_{\text{пор}},$$

де $S_{\text{дом}}$ – сумарна площа піків домішок на хроматограмі випробовуваного розчину, $S_{\text{пор}}$ – середня площа піка протіонаміду на хроматограмі 1 % порівняльного розчину.

Розрахунок з використанням даних таблиць 2, 3 демонструє, що сумарний вміст домішок 1-8 в лікарському засобі складає 0,54 %, тобто відповідає вимогам нормативних документів.

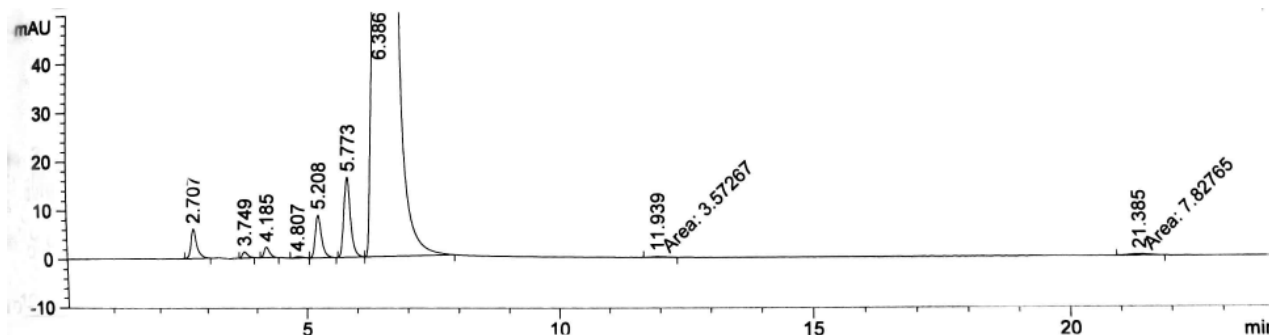


Рис. 1. Хроматограма випробовуваного розчину протіонаміду.

– наважка порошку розтертих таблеток протіонаміду (58,4 мг).

Розрахунок із використанням цифрових даних таблиці 1 і експериментальної частини показує, що $C_{\text{прот}} = 249,14$ мг (99,7% від заявленої кількості), тобто вміст діючої речовини в лікарському засобі відповідає вимогам нормативних документів.

Визначення супутніх домішок здійснювали методом порівняння з розведеним 1 % розчином основної речовини: інжектувались еталонний та випробовуваний розчини, інтегрувались піки на хроматограмах,

Висновки. Використання запропонованої схеми дослідження дає можливість кількісно визначити активний фармацевтичний інгредієнт і домішки у таблетках протіонаміду. Метод забезпечує високу точність, відтворюваність і селективність аналізу.

Перевірка методом ВЕРХ лікарського засобу протіонаміду в таблетках щодо кількісного вмісту діючої речовини і супутніх домішок показала, що препарат відповідає вимогам нормативної документації і є безпечним для споживачів.

Список літератури

1. Брицун В. Н. Противотуберкулезные свойства производных имидазола и бензимидазола / В. Н. Брицун, П. А. Карпов, А. И. Емец, М. О. Лозинский // Журн. орг. та фарм. хімії. – 2011. – Т. 9. – Вип. 3(35). – С. 3–14.
2. Державна Фармакопея України, Т. 1. – Харків : «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – 1128 с.
3. Страчунский Л. С. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Л. С. Страчунский, Ю. Б. Белоусов, С. Н. Козлов. – Смоленск : НИИХ СГМА, 2007. – 464 с.

4. Феценко Ю. І. Епідеміологія туберкульозу у світі / Ю. І. Феценко, В. М. Мельник, В. Г. Матусевич, Л. Ф. Антоненко // Укр. пульмонолог. журнал. – 2003. – № 4. – С. 5–10.
5. Шелепко С. Туберкульоз в Україні / С. Шелепко // Еженедельник Аптека. – 2015. – № 12. – С. 983. <http://www.apteka.ua/article/327618>
6. Synthesis and characterization of process related impurities of an antituberculosis drug-Prothionamide / K. C. Eadara, S. R. Divvela, S. B. Sawant, S. W. Gohada // Der Pharm. Chem. – 2015. – Vol. 7(3). – P. 79–84.
7. <http://www.druglab.kiev.ua/>

8. Janin Y. L. Antituberculosis drugs: ten years of research / Y. L. Janin // Bioorg. Med. Chem. – 2007. – Vol.15(7). – P. 479–2513.
9. Khairnar H. K. A review on: antituberculosis agents / H. K. Khairnar, R. J. Oswa, R. V. Antre // J. Pharm. Sci.

Bios. Res. – 2012. – Vol. 2(2). – P. 40–48.

10. Zumla A. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens / A. Zumla, P. Nahid, S. T. Cole // Nature Reviews Drug Discovery. – 2013. – Vol. 12. – P. 388–404.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ И СОПУТСТВУЮЩИХ ПРИМЕСЕЙ ПРОТИОНАМИДА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Н. Л. Тарасенко, А. Р. Шостак, В. Н. Брицун, Н. В. Останина

ГУ «Институт общественного здоровья имени О. М. Марзеева Национальной академии медицинских наук Украины», Киев

Резюме: с целью оценки качества проведено количественное определение и контроль сопутствующих примесей противотуберкулезного препарата II ряда протионамида. Исследования проводились методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, на спектрофотометрическом детекторе, в изократическом режиме с детектированием в УФ-области спектра. Количественное определение основного вещества сделано с использованием внешнего стандарта. Для установления количества примесей использовался метод сравнения с разбавленным раствором основного вещества. Показано, что по проверенным параметрам лекарственное средство соответствует требованиям нормативных документов: содержит 99,7 % от заявленного количества протионамида и $\leq 0,54$ % примесей.

Ключевые слова: протионамид, таблетки, туберкулез, препараты II ряда, контроль качества, ВЭЖХ, количественное определение, сопутствующие примеси.

RESEARCH BY HPLC METHOD THE QUANTITATIVE CONTENT AND RELATED IMPURITIES OF PROTHIONAMIDE

N. L. Tarasenko, A. R. Shostak, V. M. Britsun, N. V. Ostanina

O. Marzheyev Institute for Public Health of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv

Summary: prothionamid is anti-tuberculosis second line drug. The goal of this work is quantitative determination of the active pharmaceutical ingredient (API) and its related substances in some prothionamide tablets. Investigation was carried out by means of reversed-phase HPLC in isocratic mode with spectrophotometric detector in UV-region of spectrum. Quantitative determination of the API was made by using the external standard method. A dilute solution of the API was used to determine the amount of impurities. It is shown that the medical product complies with specified parameters of the normative documents: it contains 99.7 % of the declared quantity and the sum identified and not identified impurities ≤ 0.54 %.

Key words: prothionamide, tablets, quality control, tuberculosis, HPLC, quantitative determination, related impurities.

Отримано 24.10.2016